

我国斑鳊六个群体 mtDNA Cyt *b* 序列的遗传变异

王伟伟^{1,2}, 赵金良^{1,*}, 李思发¹

(1. 上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;

2. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 采用 PCR 技术扩增了鸭绿江、海河、长江、钱塘江、闽江、西江 6 个群体 31 尾斑鳊 (*Siniperca scherzeri*) mtDNA Cyt *b* 基因的部分序列。在长度为 781 bp 的同源序列中, 共检测到 78 个变异位点, 占分析位点数的 9.6%, 碱基替换大都发生在密码子的第三位点上; 在 31 个体中共检出 16 种单倍型。鸭绿江、海河群体与长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离较大。分子方差分析表明, 斑鳊 6 个群体间总的遗传分化水平 F_{ST} 为 0.9307 ($P < 0.01$), 差异极显著。构建的 NJ 分子系统发育树表明, 海河群体和鸭绿江群体构成了一支北方群体; 长江群体、闽江群体和西江群体构成了南方群体; 而钱塘江群体单独聚为一支。这表明我国斑鳊不同地理群体间已产生明显的遗传分化, 但未与其自然地理分布格局呈完全对应关系。

关键词: 斑鳊; 群体; Cyt *b* 基因; 遗传变异

中图分类号: Q959.483.09; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2006) 06–0589–05

Genetic Variation of the Mitochondrial DNA Cyt *b* Among Six Populations of *Siniperca scherzeri* in China

WANG Wei-wei^{1,2}, ZHAO Jin-liang^{1,*}, LI Si-fa¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture,

Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The mitochondrial DNA Cyt *b* of 31 *Siniperca scherzeri* collected from the Yalujiang River, Haihe River, Yangtze River, Qiantangjiang River, Minjiang River and Xijiang River were amplified and partially sequenced using the PCR technique. The results showed that 78 nucleotide sites were variable along 781 bp length of homologous sequence (9.6%), base substitutions happened mostly at the third codon position, and sixteen haplotypes were detected in 31 individuals. Genetic distances between the Yalujiang, Haihe population and the Yangtze, Qiantangjiang, Minjiang and Xijiang population were higher. The analysis of molecular variance (AMOVA) supported the conclusion that there was significant genetic differentiation between these six geographical populations ($F_{ST} = 0.9307$, $P < 0.01$). A neighbour joining tree showed that the Yalujiang and Haihe population formed the northern clade and the Yangtze, Minjiang and Xijiang populations formed the southern clade. The Qiantangjiang population formed an independent clade instead of merging into the southern clade. The phylogenetic relationship revealed by the Cyt *b* sequence was not consistent with the species' geographical distribution patterns.

Key words: *Siniperca scherzeri*; Population; Cyt *b* sequence; Genetic variation

斑鳊 (*Siniperca scherzeri* Steindachner) 是重要的淡水名贵经济鱼类之一。隶属鲈形目 (Perciformes) 鲈科 (Serranidae) 鳊属 (*Siniperca*), 为东

亚特有种类, 广泛分布于我国内陆水域, 在朝鲜和越南也有分布 (Zhou et al, 1988; Li, 1991)。斑鳊的分类学研究过去较为模糊, 根据 Zhou et al

* 收稿日期: 2006–06–14; 接受日期: 2006–08–11

基金项目: 上海市教委项目 (05KZ02); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jlzhao@shfu.edu.cn

第一作者简介: 王伟伟 (1979–), 女, 助教, 研究方向为水产动物遗传育种。

(1988)对鳊亚科鱼类分类的重新整理,广西鳊(*S. kwangsiensis* Fang)、钱氏鳊(*S. chieni* Fang)、朱氏鳊(*S. chui* Fang & Chong)为斑鳊的变异个体;河南百泉鳊(*S. paichuanensis* Fu)、四川鳊(*S. szechuanensis* Shith)与斑鳊同物异名。关于斑鳊是否有地方种(亚种)的问题还有争议, Kong & Zhou (1993)对其肌肉中 LDH 同工酶表型研究,发现广西斑鳊和福建斑鳊的酶谱差别不大,认为它们为同一种。

由于天然水域生态环境不断遭到人为破坏以及渔业上的过度捕捞,斑鳊的野生资源正在下降(Liang, 1996)。而且,迄今为止,关于斑鳊的遗传背景资料尚不明了。Wang et al (2006)对 mtDNA 高度变异控制区的序列分析表明,我国斑鳊群体的遗传多样性较丰富,群体间有明显的遗传分化,钱塘江群体的分化较为特别。细胞色素 *b* (cytochrome *b*, Cyt *b*) 是动物 mtDNA 中结构和功能了解较为清楚的蛋白质基因,进化速度适中,是鱼类系统发育学、群体遗传学研究应用较多的重要分子标记(Guo et al, 2004)。本研究通过测定斑鳊不同群体 Cyt *b* 基因的序列,进一步了解我国斑鳊群体的遗传特征和遗传分化,为其分类、遗传保护和资源利用提供资料和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑鳊 6 个地理群体样本分别采集于鸭绿江(YL)、海河(HH)、长江(YZ)、钱塘江(QT)、闽江(MJ)、西江(XJ)(表 1)。剪取活鱼的尾鳍,于 95% 的乙醇中固定和保存。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 DNA 的提取采用标准方法(Sambrook et al, 2002)。取 20—30 mg 酒精固定的尾鳍,剪碎。待酒精完全挥发后,用蛋白酶 K (20 mg/mL) 56 ℃消化过夜(约 10 h),酚-氯仿法提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增与测序 扩增 Cyt *b* 所用的特异性引物参照 Xiao et al (2001)。引物 L1474 (5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TG-3') 和 H15915 (5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3') 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系为 50 μL: 10 × Buffer 溶液 5 μL, dNTP 1 μL (10 μmol/L), 两种引物各 2 μL (10 μmol/L), 模板 DNA 2 μL (100 ng/μL), Taq DNA 聚合酶 1 μL (2.5 U/μL), 用去离子灭菌水补足 50 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 30 s, 56 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min; 4 ℃保存。

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,对特异性扩增产物进行纯化,由上海生工生物工程技术服务有限公司用 ABI 377 DNA 自动测序仪进行序列测定。

1.3 数据分析

使用 BioEdit 软件 (Hall, 1998) 对序列进行同源比对,并辅以手工校正。用 Arlequin 3.0 软件 (Excoffier et al, 2006) 中的 AMOVA 计算群体间的分化水平 (F_{ST})。应用 MAGA 3.0 软件 (Kumar et al, 2004) 中 Kimura 双参数法计算群体间遗传距离。以同属的鳊 (*S. chuatsi*)、大眼鳊 (*S. kneri*) 作为外群,用 MAGA3.0 软件构建邻接 (Neighbour-joining, NJ) 树,主要节点支持率用 1000 次重复 bootstrap 检验。

表 1 斑鳊采集地点和分析样本数
Tab. 1 Population, sampling location and number of *Siniperca scherzeri*

群体 Population	采集地点 Sampling location	样本数 Number
鸭绿江 Yalujiang River	辽宁省宽甸县水丰水库	5
海河 Haihe River	河南省鹤壁市盘石头水库	5
长江 Yangtze River	安徽省池州市秋浦河	5
钱塘江 Qiantangjiang River	浙江省淳安县千岛湖	5
闽江 Minjiang River	福建省顺昌县富屯溪	6
西江 Xijiang River	广西壮族自治区融水县融江	5

2 结果

2.1 碱基组成与变异

对斑鳊 6 个群体 31 尾个体的 Cyt b 基因片断序列进行比对, 获得了长度为 781 bp 的同源序列 (GenBank 登录序列号分别为: DQ789599—DQ789628, DQ792715)。T、C、A、G 四种碱基的组成分别为 27.5%、32.3%、24.7%、15.5%, A + T

含量 (52.2%) 略高于 G + C 含量 (47.8%), 未见有碱基缺失和插入。

共检测到 78 个变异位点 (简约信息位点 72 个), 占分析位点总数的 9.6% (图 1), 其中转换位点 66 个, 颠换位点 8 个, 转换与颠换共同存在的位点 4 个。碱基替换大多发生在密码子的第 3 位点 (70 个), 其次是第 1 位点 (6 个), 第 2 位点较保守 (2 个)。

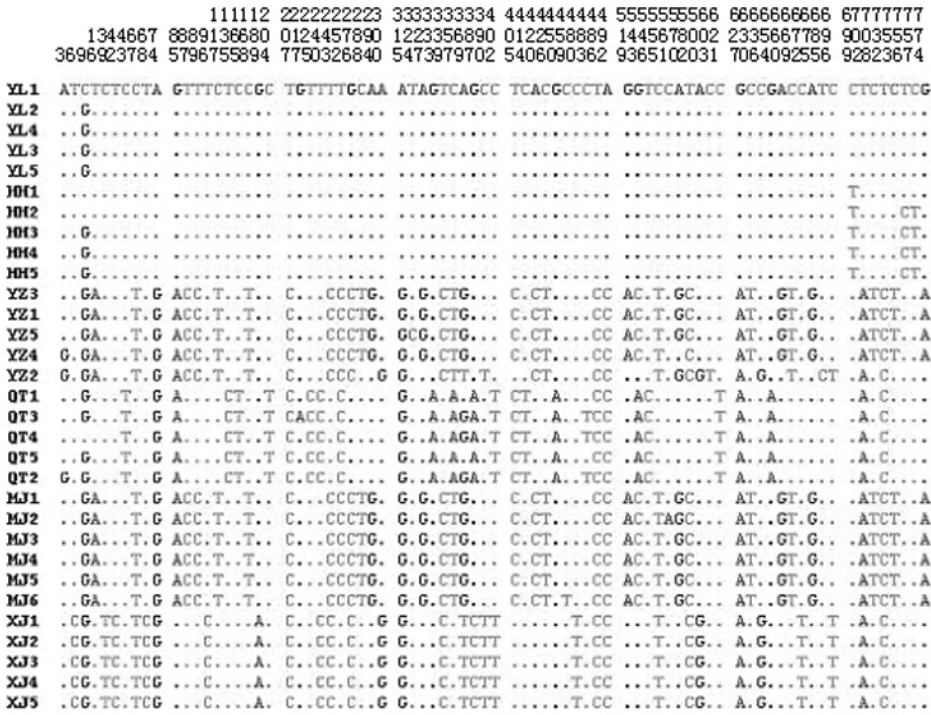


图 1 斑鳊 6 个群体 Cyt b 序列的变异位点
Fig. 1 Variable sites of Cyt b sequence among six populations of *Siniperca scherzeri*
图上数字由上至下为碱基变异位点在所测序列中的位置。
The numerals at the top indicate the location of the variable sites in the sequence analysis.

31 尾斑鳊个体中共检出 16 种单倍型: 鸭绿江群体两种单倍型, 海河群体 3 种单倍型, 长江群体 4 种单倍型, 钱塘江群体 4 种单倍型, 闽江群体 3 种单倍型, 西江群体一种单倍型。除闽江群体和长江群体共享一种单倍型外, 其他不同群体间均无共享单倍型, 且不同单倍型在许多位点上表现有明显特异性。

2.2 遗传距离和遗传分化水平

斑鳊六群体间的遗传距离如表 2。鸭绿江与海河群体间的遗传距离最小 (0.2%), 而它们与长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离较大 (3.2%—5.3%)。

AMOVA 分析表明, 斑鳊 6 群体间总的遗传分化指数 F_{ST} 为 0.9307 ($P < 0.01$), 差异极显著。除闽江和长江群体间的遗传分化水平最低 ($F_{ST} = 0.0544$, $P > 0.05$), 差异不显著外, 其余各群体间的遗传分化均极显著 ($F_{ST} = 0.7034—0.9934$, $P < 0.01$)。

2.3 分子系统发育树

斑鳊 6 个群体单倍型的 NJ 分子系统发育树如图 2。鸭绿江群体和海河群体聚为一支; 闽江群体、长江群体与西江群体聚为另一支; 而钱塘江群体单独聚为一支。钱塘江、西江群体内个体能单独聚群, 而鸭绿江群体与海河群体、闽江群体与长江

表 2 斑鳊 6 群体间 Cyt b 基因遗传距离 (%)
Tab. 2 Genetic distances between six populations of *Siniperca scherzeri* from Cyt b sequences

	鸭绿江 Yalujiang	海河 Haihe	长江 Yangtze	钱塘江 Qiantangjiang	闽江 Minjiang
海河 Haihe	0.2				
长江 Yangtze	3.2	3.4			
钱塘江 Qiantangjiang	3.8	4.0	4.9		
闽江 Minjiang	5.3	5.5	2.6	5.7	
西江 Xijiang	4.1	4.4	4.4	5.1	5.5

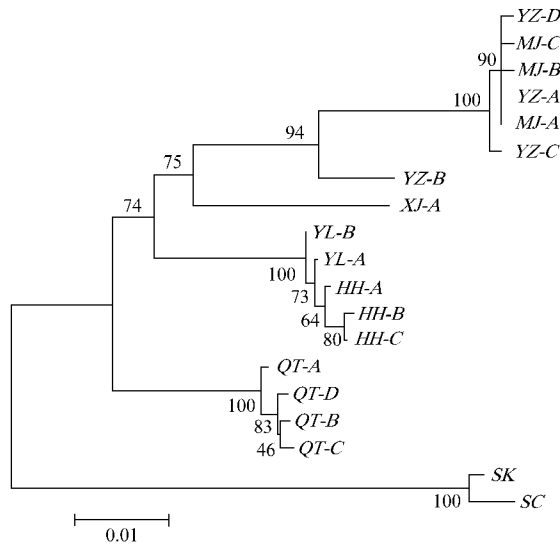


图 2 斑鳊 6 个群体 Cyt b 单倍型的 NJ 树
Fig. 2 Neighbour Joined tree of the Cyt b among haplotypes from six populations of *Siniperca scherzeri*
SC: 鳊 (*S. chuatsi*); SK: 大眼鳊 (*S. kneri*); YZ-A 与 MJ-A 为共享单倍型 (Haplotype YZ-A is identical to haplotype MJ-A)。

群体间有个体交叉。

3 讨论

3.1 斑鳊不同群体 Cyt b 基因序列的变异

本研究中斑鳊不同群体 Cyt b 序列中的变异位点占总数的 9.6%，且碱基替换绝大多数发生在密码子的第 3 位点上，远高于第 1 位点和第 2 位点上的变异。由于 Cyt b 基因的进化速率相对较慢、变异水平较低，Cyt b 基因序列揭示的斑鳊群体的参考文献：

传变异水平（数值）略低于控制区基因序列的分析结果（Wang et al, 2006）。尽管如此，我国斑鳊群体的遗传变异水平仍较高。这可能与斑鳊自然分布区域范围广，南北跨度近 20 个纬度，生态环境条件迥异，遗传变异积累丰富有关。

3.2 斑鳊不同地理群体的遗传分化

群体间的遗传关系表明，鸭绿江群体和海河群体间遗传距离为最小，亲缘关系较近，而它们与长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离大，亲缘关系相对较远。AMOVA 分析表明，除闽江和长江群体共享一种单倍型，遗传分化不显著外，其余群体间的遗传分化水平较高。这些表明我国斑鳊不同地理群体间已产生了明显的遗传分化。

分子系统发育树表明，6 个群体关系与其自然地理分布基本一致，但未呈完全对应关系。鸭绿江和海河群体聚为一支，构成北方群体；长江、闽江与西江群体构成了南方群体；而钱塘江群体单独聚为一支，未与地理位置相近的南方群体聚在一起，这可能是由于基因的分子进化与物种群体的分化未表现完全一致所致。而在控制区序列的分子系统发育树中，钱塘江群体表现与北方鸭绿江群体聚为一支（Wang et al, 2006），推测 Cyt b 基因的所受进化压力与控制区基因不同，它们的进化速率、进化方向不相同。

北方群体中鸭绿江群体和海河群体表现出较近的亲缘关系，这可能与地质史上鸭绿江和海河同属于古黄河水系，伴随现水系的形成，群体间较晚时期才开始分化有关（Xie, 1981；1986）。南方群体中，西江群体内个体单独聚群，闽江群体与长江群体未能单独聚群。但我们发现，广西西江与福建闽江群体间已产生了较明显的遗传分化，分化程度达到何种分类单元水平尚待进一步研究证实。

致谢：本研究采样中得到辽宁省丹东市水产技术推广站、河南师范大学李学军博士、安徽省池州市贵池区水产局、福建省顺昌县畜牧水产局、广西壮族自治区融水县畜牧水产局、浙江省淳安县千岛湖渔民等单位和个人的大力协助，特此致谢。

- Guo XH, Liu SJ, Liu Q, Liu Y. 2004. New progress on mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Genet Sin*, **31** (9): 983–1000. [郭新红, 刘少军, 刘巧, 刘筠. 2004. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, **31** (9): 983–1000.]
- Hall TA. 1998. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, **41**: 95–98.
- Kong XY, Zhou CW. 1992. Comparative studies on LDH isozyme in sinipercinae fishes of China [J]. *J Ocean Univ Qingdao*, **22** (1): 103–109. [孔晓瑜, 周才武. 1992. 鳊亚科 Sinipercinae 鱼类的 LDH 同工酶的比较研究. 青岛海洋大学学报, **22** (1): 103–109.]
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, **5**: 150–163.
- Li SZ. 1991. Geographic distribution of the Sinipercinae fishes [J]. *Chn Zool*, **26** (4): 40–44. [李思忠. 1991. 鳊亚科鱼类地理分布的研究. 动物学杂志, **26** (4): 40–44.]
- Liang XF. 1996. Study on mandarin fish and its culture home and abroad [J]. *Fish Sci Technol Inform*, **23** (1): 13–17. [梁旭方. 1996. 国内外鳊类研究及养殖概况. 水产科技情报, **23** (1): 13–17.]
- Sambrook J, Russell DW. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed [M]. Huang PT, Wang JX, Zhu HC, transl. Beijing: Science Press. [萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 2002. 分子克隆实验指南. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 北京: 科学出版社.]
- Wang WW, Zhao JL, Li SF. 2006. Genetic variation of the mitochondrial DNA control region among 5 populations of *Siniperca scherzeri* Steindachner in China [J]. *J Shanghai Fish Univ*, **15** (4): 398–402. [王伟伟, 赵金良, 李思发. 2006. 我国斑鳅不同群体 mtDNA 控制区序列的遗传变异. 上海水产大学学报, **15** (4): 398–402.]
- Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography and co-evolution of a special group restricted in East Asia [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **18**: 163–173.
- Xie YH. 1981. Ichthyofauna of the Liaohe [A]. In: the Chinese Ichthyological Society. Transactions of the Chinese Ichthyological Society. No. 2 [M]. Beijing: Sci Press, 111–120. [解玉浩. 1981. 辽河的鱼类区系. 见: 中国鱼类学会. 鱼类学论文集. 第二集. 北京: 科学出版社, 111–120.]
- Xie YH. 1986. The fish fauna of the Yalu River [A]. In: the Chinese Ichthyological Society. Transactions of the Chinese Ichthyological Society. No. 5 [M]. Beijing: Sci Press, 91–100. [解玉浩. 1986. 鸭绿江的鱼类区系. 见: 中国鱼类学会. 鱼类学论文集. 第五集. 北京: 科学出版社, 91–100.]
- Zhou CW, Yang Q, Cai DL. 1988. On the classification and distribution of the Sinipercinae fishes (Family Serranidae) [J]. *Zool Res*, **9** (2): 113–125. [周才武, 杨青, 蔡德霖. 1988. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布. 动物学研究, **9** (2): 113–126.]

本刊编委马原野研究员简介

马原野, 男。1982年毕业于云南大学生物系动物学专业; 同年到中国科学院昆明动物研究所灵长类研究室工作。1987—1988年在美国耶鲁大学神经生物学系做博士后研究; 1995—1996年英国牛津大学实验心理系作访问科学家; 1996—1999年美国亚利桑那大学心理学系作访问科学家。现任昆明动物研究所中国科学院知识创新工程“认知病理障碍组”学科带头人, 研究员, 博士生导师。

从事灵长类脑认知行为的研究。1999年着手建立灵长类认知神经科学实验室, 是一个独具特色的、以大脑认知行为活动为主要研究对象的电生理实验室。主要利用现代生物物理学、神经电生理学、神经行为学、神经药理学及生理心理学手段, 探讨意识、认知过程的起源、演化及其脑机制。目前主要进行啮齿类和非人灵长类猕猴的大脑前额叶认知功能的研究, 探讨其功能异常与某些精神、神经疾病等的关系以及药物成瘾的心理戒断的脑机制。

目前从事的研究项目有: 国家“973”项目“特征捆绑和不变性知觉的脑认知功能成像”, 中芬合作项目“人类和猕猴大脑前额叶在记忆和注意过程中的作用”, 国家基金委重点项目“猕猴顶叶、前额叶的空间坐标系”, 中国科学院知识创新工程重要方向项目“拓扑视觉不变性的神经调控处理环路”, 国家科技支撑计划项目“吸毒人员瞳孔检测研究”, 云南省“十一·五”重点科技攻关项目“一种无依赖性戒毒药物的研发”等。

已在 *Science* 等国际核心刊物上发表论文约 40 余篇。2001 年“恒河猴工作记忆的儿茶酚胺机制”获云南省科学技术奖一等奖。猕猴大脑神经元多单位电活动室外记录系统等 5 项获专利授权。